

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
PARIS

(11) N° de publication :  
(à n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction)

2 751 223

(21) N° d'enregistrement national : 96 09337

(51) Int Cl<sup>6</sup> : A 61 K 48/00, A 61 K 39/23, 39/205 // C 12 N 15/85

(12)

## DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

(22) Date de dépôt : 19.07.96.

(30) Priorité :

(43) Date de la mise à disposition du public de la  
demande : 23.01.98 Bulletin 98/04.

(56) Liste des documents cités dans le rapport de  
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du  
présent fascicule.*

(60) Références à d'autres documents nationaux  
apparentés :

(71) Demandeur(s) : RHONE MERIEUX SOCIETE  
ANONYME — FR.

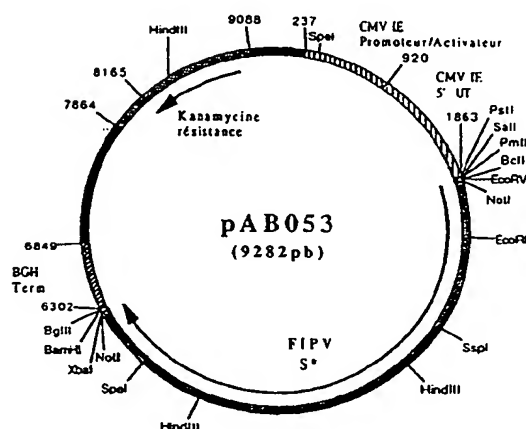
(72) Inventeur(s) : AUDONNET JEAN CHRISTOPHE  
FRANCIS, BOUCHARDON ANNABELLE, BAUDU  
PHILIPPE et RIVIERE MICHEL EMILE ALBERT.

(73) Titulaire(s) :

(74) Mandataire : CABINET LAVOIX.

### (54) FORMULE DE VACCIN POLYNUCLEOTIDIQUE FELIN.

(57) La formule de vaccin pour chat comprenant au moins  
trois valences de vaccin polynucléotidique comprenant  
chacune un plasmide intégrant, de manière à l'exprimer in  
vivo dans les cellules hôtes, un gène d'une valence de pa-  
thogène de chat, ces valences étant choisies parmi le  
groupe consistant en virus de la leucémie féline, virus de la  
panleucopénie, virus de la péritonite infectieuse, virus du  
coryza, virus de la calicivirose, virus de l'immunodéficience  
féline et éventuellement virus de la rage, les plasmides  
comportant, pour chaque valence, un ou plusieurs des gé-  
nes choisis parmi le groupe consistant en env et gag pour  
la leucémie féline, VP2 pour la panleucopénie, S modifié,  
M, N pour la péritonite infectieuse, gB et gD pour le coryza,  
capside pour la calicivirose, env et gag/pro pour l'immuno-  
déficience féline et G pour la rage.



FR 2 751 223 - A1



## FORMULE DE VACCIN POLYNUCLEOTIDIQUE FELIN

La présente invention a trait à une formule de vaccin permettant la vaccination des chats contre un certain nombre de pathologies. Elle a également trait à une méthode de vaccination correspondante.

On a déjà proposé par le passé des associations de vaccins contre certains virus canins.

Les associations développées jusqu'à présent étaient réalisées à partir de vaccins inactivés ou de vaccins vivants et éventuellement de mélanges de tels vaccins. Leur mise en oeuvre pose des problèmes de compatibilité entre valences et de stabilité. Il faut en effet assurer à la fois la compatibilité entre les différentes valences de vaccin, que ce soit au plan des différents antigènes utilisés ou au plan des formulations elles-mêmes, notamment dans le cas où l'on combine à la fois des vaccins inactivés et des vaccins vivants. Il se pose également le problème de la conservation de tels vaccins combinés et de leur innocuité notamment en présence d'adjuvant. Ces vaccins sont en général assez coûteux.

Les demandes de brevet WO-A-90 11092, WO-A-93 19183, WO-A-94 21797 et WO-A-95 20660 ont fait usage de la technique récemment développée des vaccins polynucléotidiques. On sait que ces vaccins utilisent un plasmide apte à exprimer dans les cellules de l'hôte l'antigène inséré dans le plasmide. Toutes les voies d'administration ont été proposées (intrapéritonéale, intraveineuse, intramusculaire, transcutanée, intradermique, mucosale, etc.). Différents moyens de vaccination peuvent également être utilisés, tels que ADN déposé à la surface de particules d'or et projeté de façon à pénétrer dans la peau de l'animal (Tang et al., Nature 356, 152-154, 1992) et les injecteurs par jet liquide permettant de transfecter à la fois dans la peau, le muscle, les tissus graisseux et les tissus mammaires (Furth et al., Analytical Biochemistry, 205, 365-368, 1992).

Les vaccins polynucléotidiques peuvent utiliser aussi bien des ADN nus que des ADN formulés par exemple au sein de liposomes ou de lipides cationiques.

L'invention se propose donc de fournir une formule de

vaccin multivalent permettant d'assurer une vaccination contre un certain nombre de virus pathogènes canins.

5 Un autre objectif de l'invention est de fournir une telle formule de vaccin associant différentes valences tout en présentant tous les critères requis de compatibilité et de stabilité des valences entre elles.

Un autre objectif de l'invention est de fournir une telle formule de vaccin permettant d'associer différentes valences dans un même véhicule.

10 Un autre objectif de l'invention est de fournir un tel vaccin qui soit de mise en oeuvre aisée et peu coûteuse.

Un autre objectif, encore de l'invention est de fournir une méthode de vaccination des chats qui permette d'obtenir une protection, y compris une protection multivalente, avec un  
15 niveau élevé d'efficacité et de longue durée, et avec une bonne innocuité.

La présente invention a donc pour objet une formule de vaccin destiné au chat comprenant au moins trois valences de vaccin polynucléotidique comprenant chacune un plasmide  
20 intégrant, de manière à l'exprimer in vivo dans les cellules hôtes, un gène d'une valence de pathogène félin, ces valences étant choisies parmi le groupe consistant en virus de la leucémie féline (FeLV), virus de la panleucopénie (FPV), virus de la péritonite infectieuse (FIPV), virus du coryza (FHV),  
25 virus de la calicivirose (FCV), virus de l'immunodéficience féline (FIV) et éventuellement virus de la rage (rhabdovirus), les plasmides comprenant, pour chaque valence, un ou plusieurs des gènes choisis parmi le groupe consistant en env et gag/pol pour la leucémie féline, VP2 pour la panleucopénie, S modifié  
30 (ou S\*) et M pour la péritonite infectieuse, gB et gD pour le coryza, capsid pour la calicivirose, env et gag/pro pour l'immunodéficience féline et G pour la rage.

Par valence, dans la présente invention, on entend au moins un antigène assurant une protection contre le virus du  
35 pathogène considéré, la valence pouvant contenir, à titre de sous-valence, un ou plusieurs gènes naturels ou modifiés d'une ou plusieurs souches du pathogène considéré.

Par gène d'agent pathogène, on entend non seulement le gène complet, mais aussi les séquences nucléotidiques

différentes, y compris fragments, conservant la capacité à induire une réponse protectrice. La notion de gène recouvre les séquences nucléotidiques équivalentes à celles décrites précisément dans les exemples, c'est-à-dire les séquences différentes mais codant pour la même protéine. Elle recouvre aussi les séquences nucléotidiques d'autres souches du pathogène considéré, assurant une protection croisée ou une protection spécifique de souche ou de groupe de souche. Elle recouvre encore les séquences nucléotidiques qui ont été modifiées pour faciliter l'expression in vivo par l'animal hôte mais codant pour la même protéine.

De préférence, la formule de vaccin selon l'invention comprend les valences panleucopénie, coryza et calicivirose.

On pourra ajouter les valences leucémie féline, immunodéficience féline et/ou péritonite infectieuse.

En ce qui concerne la valence coryza, on préfère mettre en oeuvre les deux gènes codant pour gB et gD, dans des plasmides différents ou dans un seul et même plasmide, ou utiliser l'un ou l'autre de ces gènes.

Pour la valence leucémie féline, on utilise de préférence les deux gènes env et gag/pol intégrés dans deux plasmides différents ou dans un seul et même plasmide ou le gène env seul.

Pour la valence immunodéficience féline, on préférera utiliser les deux gènes env et gag/pro dans des plasmides différents ou dans un seul et même plasmide, ou un seul de ces gènes. De préférence encore, on utilise le gène env de FeLV-A ou les gènes env de FeLV-A et FeLV-B.

Pour la valence péritonite infectieuse, on préfère utiliser l'ensemble des deux gènes M et S modifié dans deux plasmides différents ou dans un seul et même plasmide, ou l'un ou l'autre de ces gènes. S sera modifié pour rendre inactifs les épitopes facilitants majeurs, de préférence selon l'enseignement de la demande PCT/FR95/01128.

La formule de vaccin selon l'invention pourra se présenter sous un volume de dose compris entre 0,1 et 3 ml et en particulier entre 0,5 et 1 ml.

La dose sera généralement comprise entre 10 ng et 1 mg, de préférence entre 100 ng et 500 µg et plus préférentiellement

encore entre 1 µg et 250 µg par type de plasmide.

On utilisera de préférence des plasmides nus, simplement placés dans le véhicule de vaccination qui sera en général de l'eau physiologique (NaCl 0,9 %), de l'eau ultrapure, du tampon TE, etc. On peut bien entendu utiliser toutes les formes de vaccin polynucléotidique décrites dans l'art antérieur.

Chaque plasmide comprend un promoteur apte à assurer l'expression du gène inséré sous sa dépendance dans les cellules hôtes. Il s'agira en général d'un promoteur eucaryote fort et en particulier d'un promoteur précoce du cytomégalo virus CMV-IE, d'origine humaine ou murine, ou encore éventuellement d'une autre origine telle que rat, cochon, cobaye.

De manière plus générale, le promoteur pourra être soit d'origine virale, soit d'origine cellulaire. Comme promoteur viral, on peut citer le promoteur précoce ou tardif du virus SV40 ou le promoteur LTR du virus du Sarcome de Rous. Il peut aussi s'agir d'un promoteur du virus dont provient le gène, par exemple le promoteur propre au gène.

Comme promoteur cellulaire, on peut citer le promoteur d'un gène du cytosquelette, tel que par exemple le promoteur de la desmine (Bolmont et al., Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology, 1990, 22, 117-122 ; et ZHENLIN et al., Gene, 1989, 78, 243-254), ou encore le promoteur de l'actine.

Lorsque plusieurs gènes sont présents dans le même plasmide, ceux-ci peuvent être présentés dans la même unité de transcription ou dans deux unités différentes.

La combinaison des différentes valences du vaccin selon l'invention peut être effectuée, de préférence, par mélange de plasmides polynucléotidiques exprimant le ou les antigène(s) de chaque valence, mais on peut également prévoir de faire exprimer des antigènes de plusieurs valences par un même plasmide.

L'invention a encore pour objet des formules de vaccin monovalent comprenant un ou plusieurs plasmides codant pour un ou plusieurs gènes de l'un des virus ci-dessus, les gènes étant ceux décrits plus haut. En dehors de leur caractère monovalent, ces formules peuvent reprendre les caractéristiques énoncées plus haut en ce qui concerne le choix des gènes, leurs

combinaisons, la composition des plasmides, les volumes de dose, les doses, etc.

Les formules de vaccin monovalent peuvent aussi être utilisées (i) pour la préparation d'une formule de vaccin polyvalent tel que décrit plus haut, (ii) à titre individuel contre la pathologie propre, (iii) associées à un vaccin d'un autre type (entier vivant ou inactivé, recombinant, sous-unité) contre une autre pathologie ou (iv) comme rappel d'un vaccin comme décrit ci-après.

La présente invention a en effet encore pour objet l'utilisation d'un ou de plusieurs plasmides selon l'invention pour la fabrication d'un vaccin destiné à vacciner les chats primo-vaccinés au moyen d'un premier vaccin classique (monovalent ou multi-valent) du type de ceux de l'art antérieur, choisi notamment dans le groupe consistant en vaccin entier vivant, vaccin entier inactivé, vaccin de sous-unité, vaccin recombinant, ce premier vaccin présentant (c'est-à-dire contenant ou pouvant exprimer) le ou les antigène(s) codé(s) par le ou les plasmides ou antigène(s) assurant une protection croisée.

De manière remarquable, le vaccin polynucléotidique a un effet de rappel puissant se traduisant par une amplification de la réponse immunitaire et l'instauration d'une immunité de longue durée.

De manière générale, les vaccins de primo-vaccination pourront être choisis parmi les vaccins commerciaux disponibles auprès des différents producteurs de vaccins vétérinaires.

L'invention a aussi pour objet un kit de vaccination regroupant un vaccin de primo-vaccination tel que décrit ci-dessus et une formule de vaccin selon l'invention pour le rappel. Elle a aussi trait à une formule de vaccin selon l'invention accompagnée d'une notice indiquant l'usage de cette formule comme rappel d'une primo-vaccination telle que décrite ci-avant.

La présente invention a également pour objet une méthode de vaccination des chats, comprenant l'administration d'une formule de vaccin efficace telle que décrit plus haut. Cette méthode de vaccination comprend l'administration d'une ou de plusieurs doses de formule de vaccin, ces doses pouvant être

administrées successivement dans un court laps de temps et/ou successivement à des moments éloignés l'un de l'autre.

5 Les formules de vaccin selon l'invention pourront être administrées, dans le cadre de cette méthode de vaccination, par les différentes voies d'administration proposées dans l'art antérieur pour la vaccination polynucléotidique et au moyen des techniques d'administration connues.

10 L'invention a encore pour objet la méthode de vaccination consistant à faire une primo-vaccination telle que décrite ci-dessus et un rappel avec une formule de vaccin selon l'invention.

15 Dans une forme de mise en oeuvre préférée du procédé selon l'invention, on administre dans un premier temps, à l'animal, une dose efficace du vaccin de type classique, notamment inactivé, vivant, atténué ou recombinant, ou encore un vaccin de sous-unité de façon à assurer une primo-vaccination, et, après un délai de préférence de 2 à 6 semaines, on assure l'administration du vaccin polyvalent ou monovalent selon l'invention.

20 L'efficacité de la présentation des antigènes au système immunitaire varie en fonction des tissus. En particulier, les muqueuses de l'arbre respiratoire servent de barrière à l'entrée des pathogènes et sont associées à des tissus lymphoïdes qui supportent une immunité locale. L'administration d'un vaccin par contact avec les muqueuses, en particulier muqueuses buccale, pharyngée et région bronchique présente un intérêt certain pour la vaccination contre les pathologies respiratoires et digestives.

30 En conséquence, les voies d'administration mucosales font partie d'un mode d'administration préféré pour l'invention, utilisant notamment la nébulisation ou spray ou l'eau de boisson. Les formules de vaccin et méthodes de vaccination selon l'invention pourront être appliquées dans ce cadre.

35 L'invention va être maintenant décrite plus en détails à l'aide de modes de réalisation de l'invention pris en référence aux dessins annexés.

**Liste des figures**

- Figure N° 1 : Plasmide pVR1012  
Figure N° 2 : Plasmide pPB179  
Figure N° 3 : Séquence du gène env FeLV-B  
5 Figure N° 4 : Plasmide pPB180  
Figure N° 5 : Séquence gag/pol du virus FeLV-A souche Glasgow-1  
Figure N° 6 : Plasmide pPB181  
Figure N° 7 : Plasmide pAB009  
Figure N° 8 : Plasmide pAB053  
10 Figure N° 9 : Plasmide pAB052  
Figure N° 10 : Plasmide pAB056  
Figure N° 11 : Plasmide pAB028  
Figure N° 12 : Plasmide pAB029  
Figure N° 13 : Plasmide pAB010  
15 Figure N° 14 : Plasmide pAB030  
Figure N° 15 : Plasmide pAB083  
Figure N° 16 : Plasmide pAB041

**Liste des séquences SEQ ID N°**

- 20 SEQ ID N° 1 : Oligonucléotide PB247  
SEQ ID N° 2 : Oligonucléotide PB249  
SEQ ID N° 3 : Oligonucléotide PB281  
SEQ ID N° 4 : Oligonucléotide PB282  
SEQ ID N° 5 : Séquence du gène env du virus FeLV-B  
25 SEQ ID N° 6 : Oligonucléotide PB283  
SEQ ID N° 7 : Oligonucléotide PB284  
SEQ ID N° 8 : Séquence du gène gag/pol du virus FeLV-A (Glasgow-1)  
SEQ ID N° 9 : Oligonucléotide AB021  
SEQ ID N° 10 : Oligonucléotide AB024  
30 SEQ ID N° 11 : Oligonucléotide AB103  
SEQ ID N° 12 : Oligonucléotide AB112  
SEQ ID N° 13 : Oligonucléotide AB113



- SEQ ID N° 14 : Oligonucléotide AB104  
SEQ ID N° 15 : Oligonucléotide AB101  
SEQ ID N° 16 : Oligonucléotide AB102  
SEQ ID N° 17 : Oligonucléotide AB106  
5 SEQ ID N° 18 : Oligonucléotide AB107  
SEQ ID N° 19 : Oligonucléotide AB061  
SEQ ID N° 20 : Oligonucléotide AB064  
SEQ ID N° 21 : Oligonucléotide AB065  
SEQ ID N° 22 : Oligonucléotide AB066  
10 SEQ ID N° 23 : Oligonucléotide AB025  
SEQ ID N° 24 : Oligonucléotide AB026  
SEQ ID N° 25 : Oligonucléotide AB067  
SEQ ID N° 26 : Oligonucléotide AB070  
SEQ ID N° 27 : Oligonucléotide AB154  
15 SEQ ID N° 28 : Oligonucléotide AB155  
SEQ ID N° 29 : Oligonucléotide AB011  
SEQ ID N° 30 : Oligonucléotide AB012

## EXEMPLES

### Exemple 1 : Culture des virus

Les virus sont cultivés sur le système cellulaire approprié jusqu'à obtention d'un  
5 effet cytopathique. Les systèmes cellulaires à utiliser pour chaque virus sont  
bien connus de l'homme du métier. Brielèvement, des cellules sensibles au virus  
utilisé, cultivées en milieu minimum essentiel de Eagle (milieu "MEM) ou un  
autre milieu approprié, sont inoculées avec la souche virale étudiée en utilisant  
10 une multiplicité d'infection de 1. Les cellules infectées sont alors incubées à  
37°C pendant le temps nécessaire à l'apparition d'un effet cytopathique  
complet (en moyenne 36 heures).

### Exemple 2 : Extraction des ADNs génomiques viraux:

Après culture, le surnageant et les cellules lysées sont récoltées et la totalité de  
15 la suspension virale est centrifugée à 1000 g pendant 10 minutes à + 4°C  
pour éliminer les débris cellulaires. Les particules virales sont alors récoltées par  
ultracentrifugation à 400000 g pendant 1 heure à + 4°C. Le culot est repris  
dans un volume minimum de tampon (Tris 10 mM, EDTA 1 mM). Cette  
suspension virale concentrée est traitée par la protéinase K (100 µg/ml final) en  
20 présence de sodium dodecyl sulfate (SDS) (0,5% final) pendant 2 heures à  
37°C. L'ADN viral est ensuite extrait avec un mélange de phénol/chloroforme,  
puis précipité avec 2 volumes d'éthanol absolu. Après une nuit à - 20°C, l'ADN  
est centrifugé à 10000 g pendant 15 minutes à + 4°C. Le culot d'ADN est  
séché, puis repris dans un volume minimum d'eau ultrapure stérile. Il peut alors  
25 être digéré par des enzymes de restriction.

### Exemple 3 : Isolement des ARNs génomiques viraux

Les virus à ARN ont été purifiés selon les techniques bien connues de l'homme  
du métier. L'ARN viral génomique de chaque virus a été ensuite isolé en  
30 utilisant la technique d'extraction "thiocyanate de guanidium/phénol-  
chloroforme" décrite par P. Chomczynski et N. Sacchi (Anal. Biochem. 1987.  
162. 156-159).

**Exemple 4 : Techniques de biologie moléculaire**

Toutes les constructions de plasmides ont été réalisées en utilisant les techniques standards de biologie moléculaire décrites par J. Sambrook *et al.* (*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2<sup>nd</sup> Edition. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor. New York. 1989). Tous les fragments de restriction utilisés pour la présente invention ont été isolés en utilisant le kit "GeneClean" (BIO101 Inc. La Jolla, CA).

**Exemple 5 : Technique de RT-PCR**

Des oligonucléotides spécifiques (comportant à leurs extrémités 5' des sites de restriction pour faciliter le clonage des fragments amplifiés) ont été synthétisés de telle façon qu'ils couvrent entièrement les régions codantes des gènes devant être amplifiés (voir exemples spécifiques). La réaction de transcription inverse (RT) et l'amplification en chaîne par polymérase (PCR) ont été effectuées selon les techniques standards (Sambrook J. *et al.* 1989). Chaque réaction de RT-PCR a été faite avec un couple d'amplimers spécifiques et en prenant comme matrice l'ARN génomique viral extrait. L'ADN complémentaire amplifié a été extrait au phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25:24:1) avant d'être digéré par les enzymes de restriction.

20

**Exemple 6 : plasmide pVR1012**

Le plasmide pVR1012 (Figure N° 1) a été obtenu auprès de Vical Inc. San Diego, CA, USA. Sa construction a été décrite dans J. Hartikka *et al.* (Human Gene Therapy. 1996. 7. 1205-1217).

25

**Exemple 7 : Construction du plasmide pPB179 (gène env virus FeLV-A)**

Une réaction de RT-PCR selon la technique de l'exemple 5 a été réalisée avec l'ARN génomique du virus de la leucémie féline (FeLV-A) (Souche Glasgow-1) (M. Stewart *et al.* J. Virol. 1986. 58. 825-834), préparé selon la technique de l'exemple 3, et avec les oligonucléotides suivants:

PB247 (29 mer) (SEQ ID N° 1)

5'TTTGTCGACCATGGAAAGTCCAACGCACC 3'

PB249 (28 mer) (SEQ ID N° 2)

5'TTTGGATCCTCATGGTCGGTCCGGATCG 3'

pour amplifier un fragment de 1947 pb contenant le gène codant pour la glycoprotéine Env du virus FeLV-A (souche Glasgow-1) sous la forme d'un

5 fragment *Sall*-*Bam*HI. Après purification, le produit de RT-PCR a été digéré par *Sall* et *Bam*HI pour donner un fragment *Sall*-*Bam*HI de 1935 pb.

Ce fragment a été ligaturé avec le vecteur pVR1012 (exemple 6), préalablement digéré avec *Sall* et *Bam*HI, pour donner le plasmide pPB179 (6804 pb) (Figure N° 2).

10

#### Exemple 8 : Construction du plasmide pPB180 (gène env virus FeLV-B)

Une réaction de RT-PCR selon la technique de l'exemple 5 a été réalisée avec l'ARN génomique du virus de la leucémie féline (sous-type FeLV-B), préparé selon la technique de l'exemple 3, et avec les oligonucléotides suivants:

15 PB281 (29 mer) (SEQ ID N° 3)

5'TTTGTGCGACATGGAAGGTCCAACGCACCC 3'

PB282 (32 mer) (SEQ ID N° 4)

5'TTGGATCCTCATGGTCGGTCCGGATCATATTG 3'

pour amplifier un fragment de 2005 pb contenant le gène codant pour la  
20 glycoprotéine Env du virus FeLV-B (Figure N° 3 et SEQ ID N° 5) sous la forme d'un fragment *Sall*-*Bam*HI. Après purification, le produit de RT-PCR a été digéré par *Sall* et *Bam*HI pour donner un fragment *Sall*-*Bam*HI de 1995 pb.

Ce fragment a été ligaturé avec le vecteur pVR1012 (exemple 6), préalablement digéré avec *Sall* et *Bam*HI, pour donner le plasmide pPB180 (6863 pb) (Figure

25 N° 4).

#### Exemple 9 : Construction du plasmide pPB181 (gène FeLV gag/pol)

Une réaction de RT-PCR selon la technique de l'exemple 5 a été réalisée avec l'ARN génomique du virus de la leucémie féline (sous-type FeLV-A) (Souche  
30 Glasgow-1), préparé selon la technique de l'exemple 3, et avec les oligonucléotides suivants:

PB283 (33 mer) (SEQ ID N° 6)

5'TTGTCGACATGTCTGGAGCCTCTAGTGGGACAG 3'

PB284 (42 mer) (SEQ ID N° 7)

5'TTGGATCCTTATTTAATTACTGCAGTTCCAAGGAACTCTC 3'

pour amplifier un fragment de 3049 pb contenant la séquence codant pour la  
 5 protéine Gag et la partie 5' de la séquence codant pour la protéine Pol du virus  
 FeLV-A (souche Glasgow-1) (Figure N° 5 et SEQ ID N° 8) sous la forme d'un  
 fragment *Sall*-*Bam*HI. Après purification, le produit de RT-PCR a été digéré par  
*Sall* et *Bam*HI pour donner un fragment *Sall*-*Bam*HI de 3039 pb.

Ce fragment a été ligaturé avec le vecteur pVR1012 (exemple 6), préalablement  
 10 digéré avec *Sall* et *Bam*HI, pour donner le plasmide pPB181 (7908 pb) (Figure  
 N° 6).

#### Exemple 10 : Construction du plasmide pAB009 (gène FPV VP2)

Une réaction de PCR a été réalisée avec l'ADN génomique du virus de la  
 15 panleucopénie féline (Souche 193) (J. Martyn *et al.* J. Gen. Virol. 1990. 71.  
 2747-2753), préparé selon la technique de l'exemple 2, et avec les  
 oligonucléotides suivants:

AB021 (34 mer) (SEQ ID N° 9)

5'TGCTCTAGAGCAATGAGTGATGGAGCAGTTCAAC 3'

20 AB024 (33 mer) (SEQ ID N° 10)

5'CGCGGATCCATTAATATAATTTTCTAGGTGCTA 3'

pour amplifier un fragment de 1776 pb contenant le gène codant pour la  
 protéine de capsid VP2 du FPV. Après purification, le produit de PCR a été  
 digéré par *Xba*I et *Bam*HI pour donner un fragment *Xba*I-*Bam*HI de 1764 pb.

25 Ce fragment a été ligaturé avec le vecteur pVR1012 (exemple 6), préalablement  
 digéré avec *Xba*I et *Bam*HI, pour donner le plasmide pAB009 (6664 pb) (Figure  
 N° 7).

#### Exemple 11 : Construction du plasmide pAB053 (gène FIPV S\*)

30 Une réaction de RT-PCR selon la technique de l'exemple 5 a été réalisée avec  
 l'ARN génomique du virus de la péritonite infectieuse féline (PIF) (Souche 79-  
 1146) (R. de Groot *et al.* J. Gen. Virol. 1987. 68. 2639-2646), préparé selon

la technique de l'exemple 3, et avec les oligonucléotides suivants:

AB103 (38 mer) (SEQ ID N° 11)

5'ATAAGAATGCGGCCGCATGATTGTGCTCGTAACTTGCC 3'

AB112 (25 mer) (SEQ ID N° 12)

5 5'CGTACATGTGGAATTCCACTGGTTG 3'

pour amplifier la séquence de la partie 5' du gène codant pour la glycoprotéine S du virus sous la forme d'un fragment *NotI*-*EcoRI*. Après purification, le produit de RT-PCR de 492 pb a été digéré par *NotI* et *EcoRI* pour libérer un fragment *NotI*-*EcoRI* de 467 pb (fragment A).

10 Le plasmide pJCA089 (Demande de brevet PCT/FR95/01128) a été digéré par *EcoRI* et *SpeI* pour libérer un fragment de 3378 pb contenant la partie centrale du gène codant pour la glycoprotéine S modifiée du virus de la PIF (fragment B).

Une réaction de RT-PCR selon la technique de l'exemple 5 a été réalisée avec

15 l'ARN génomique du virus de la PIF (Souche 79-1146), préparé selon la technique de l'exemple 3, et avec les oligonucléotides suivants:

AB113 (25 mer) (SEQ ID N° 13)

5'AGAGTTGCAACTAGTTCTGATTTTG 3'

AB104 (37 mer) (SEQ ID N° 14)

20 5'ATAAGAATGCGGCCGCTTAGTGGACATGCACTTTTTC 3'

pour amplifier la séquence de la partie 3' du gène codant pour la glycoprotéine S du virus de la PIF sous la forme d'un fragment *SpeI*-*NotI*. Après purification, le produit de RT-PCR de 543 pb a été digéré par *SpeI* et *NotI* pour libérer un fragment *SpeI*-*NotI* de 519 pb (fragment C).

25 Les fragments A, B et C ont ensuite été ligaturés ensemble dans le vecteur pVR1012 (exemple 6), préalablement digéré par *NotI*, pour donner le plasmide pAB053 (9282 pb), qui contient le gène S modifié dans la bonne orientation par rapport au promoteur (Figure N° 8).

30 **Exemple 12 : Construction du plasmide pAB052 (gène FIPV M)**

Une réaction de RT-PCR selon la technique de l'exemple 5 a été réalisée avec l'ARN génomique du virus de la péritonite infectieuse féline (PIF) (Souche 79-

1146) (H. Vennema *et al.* Virology. 1991. 181. 327-335), préparé selon la technique de l'exemple 3, et avec les oligonucléotides suivants:

AB101 (37 mer) (SEQ ID N° 15)

5'ACGCGTCGACCCACCATGAAGTACATTTTGCTAATAC 3'

5 AB102 (36 mer) (SEQ ID N° 16)

5'CGCGGATCCTTACACCATATGTAATAATTTTTCATG 3'

en vue d'isoler précisément le gène codant pour la glycoprotéine M du virus de la PIF sous la forme d'un fragment Sall-BamHI. Après purification, le produit de RT-PCR de 812 pb a été digéré par Sall et BamHI pour libérer un fragment Sall-BamHI de 799 pb. Ce fragment a ensuite été ligaturé dans le vecteur pVR1012 (exemple 6), préalablement digéré par Sall et BamHI, pour donner le plasmide pAB052 (5668 pb) (Figure N° 9).

#### Exemple 13 : Construction du plasmide pAB056 (gène FIPV N)

15 Une réaction de RT-PCR selon la technique de l'exemple 5 a été réalisée avec l'ARN génomique du virus de la péritonite infectieuse féline (PIF) (Souche 79-1146) (H. Vennema *et al.* Virology. 1991. 181. 327-335), préparé selon la technique de l'exemple 3, et avec les oligonucléotides suivants:

AB106 (35 mer) (SEQ ID N° 17)

20 5'ACGCGTCGACGCCATGGCCACACAGGGACAACGCG 3'

AB107 (36 mer) (SEQ ID N° 18)

5'CGCGGATCCTTAGTTCGTAACCTCATCAATCATCTC 3'

en vue d'isoler précisément le gène codant pour la protéine N du virus de la PIF sous la forme d'un fragment Sall-BamHI. Après purification, le produit de RT-PCR de 1156 pb a été digéré par Sall et BamHI pour libérer un fragment Sall-BamHI de 1143 pb. Ce fragment a ensuite été ligaturé dans le vecteur pVR1012 (exemple 6), préalablement digéré par Sall et BamHI, pour donner le plasmide pAB056 (6011 pb) (Figure N° 10).

#### 30 Exemple 14 : Construction du plasmide pAB028 (gène FHV gB)

Une réaction de PCR a été réalisée avec l'ADN génomique de l'herpèsvirus félin (FHV-1) (Souche C27) (S. Spatz *et al.* Virology. 1993. 197. 125-36), préparé

selon la technique de l'exemple 2, et avec les oligonucléotides suivants:

AB061 (36 mer) (SEQ ID N° 19)

5'AAAAGTGCAGAATCATGTCCACTCGTGGCGATCTTG 3'

AB064 (40 mer) (SEQ ID N° 20)

5 5'ATAAGAATGCGGCCGCTTAGACAAGATTTGTTTCAGTATC 3'

pour amplifier un fragment de 2856 pb contenant le gène codant pour la glycoprotéine gB du virus FHV-1 sous la forme d'un fragment *Pst*I-*Not*I. Après purification, le produit de PCR a été digéré par *Pst*I et *Not*I pour donner un fragment *Pst*I-*Not*I de 2823 pb.

10 Ce fragment a été ligaturé avec le vecteur pVR1012 (exemple 6), préalablement digéré avec *Pst*I et *Not*I, pour donner le plasmide pAB028 (7720 pb) (Figure N° 11).

#### Exemple 15 : Construction du plasmide pAB029 (gène FHV gD)

15 Une réaction de PCR a été réalisée avec l'ADN génomique de l'herpèsvirus félin (FHV-1) (Souche C-27) (S. Spatz *et al.* J. Gen. Virol. 1994. 75. 1235-1244), préparé selon la technique de l'exemple 2, et avec les oligonucléotides suivants:

AB065 (36 mer) (SEQ ID N° 21)

5'AAAAGTGCAGCCAATGATGACACGTCTACATTTTG 3'

20 AB066 (33 mer) (SEQ ID N° 22)

5'GGAAGATCTTTAAGGATGGTGAGTTGTATGTAT 3'

pour amplifier le gène codant pour la glycoprotéine gD du virus FHV-1 sous la forme d'un fragment *Pst*I-*Bgl*II. Après purification, le produit PCR de 1147 pb a été digéré par *Pst*I et *Bgl*II pour isoler un fragment *Pst*I-*Bgl*II de 1129 pb. Ce

25 fragment a été ligaturé avec le vecteur pVR1012 (exemple 6), préalablement digéré avec *Pst*I et *Bgl*II, pour donner le plasmide pAB029 (5982 pb) (Figure N° 12).

#### Exemple 16 : Construction du plasmide pAB010 (gène FCV C)

30 Une réaction de RT-PCR selon la technique de l'exemple 5 a été réalisée avec l'ARN génomique du calicivirus félin (FCV) (Souche F9) (M. Carter *et al.* Virology. 1992. 190. 443-448), préparé selon la technique de l'exemple 3, et



avec les oligonucléotides suivants:

AB025 (33 mer) (SEQ ID N° 23)

5'ACGCGTCGACGCATGTGCTCAACCTGCGCTAAC 3'

AB026 (31 mer) (SEQ ID N° 24)

5 5'CGCGGATCCTCATAACTTAGTCATGGGACTC 3'

pour isoler le gène codant pour la protéine de capsid du virus FCV sous la forme d'un fragment *Sall*-*Bam*HI. Après purification, le produit de RT-PCR de 2042 pb a été digéré par *Sall* et *Bam*HI pour isoler un fragment *Sall*-*Bam*HI de 2029 pb. Ce fragment a été ligaturé avec le vecteur pVR1012 (exemple 6),  
10 préalablement digéré avec *Sall* et *Bam*HI, pour donner le plasmide pAB010 (6892 pb) (Figure N° 13).

#### Exemple 17 : Construction du plasmide pAB030 (gène FIV env)

Une réaction de RT-PCR selon la technique de l'exemple 5 a été réalisée avec  
15 l'ARN génomique du virus de l'immunodéficience féline (FIV) (Souche Petaluma) (R. Olmsted *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1989. 86. 8088-8096.), préparé selon la technique de l'exemple 3, et avec les oligonucléotides suivants:

AB067 (36 mer) (SEQ ID N° 25)

5'AAAACTGCAGAAGGAATGGCAGAAGGATTTGCAGCC 3'

20 AB070 (36 mer) (SEQ ID N° 26)

5'CGCGGATCCTCATTCTCCTCTTTTCAGACATGCC 3'

pour amplifier un fragment de 2592 pb contenant le gène codant pour la glycoprotéine Env du virus FIV (souche Petaluma) sous la forme d'un fragment *Pst*I-*Bam*HI. Après purification, le produit de RT-PCR a été digéré par *Pst*I et  
25 *Bam*HI pour donner un fragment *Pst*I-*Bam*HI de 2575 pb.

Ce fragment a été ligaturé avec le vecteur pVR1012 (exemple 6), préalablement digéré avec *Pst*I et *Bam*HI, pour donner le plasmide pAB030 (7436 pb) (Figure N° 14).

#### 30 Exemple 18 : Construction du plasmide pAB083 (gène FIV gag/pro)

Une réaction de RT-PCR selon la technique de l'exemple 5 a été réalisée avec l'ARN génomique du virus de l'immunodéficience féline (FIV) (Souche Petaluma)

(R. Olmsted *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1989. 86. 8088-8096.), préparé selon la technique de l'exemple 3, et avec les oligonucléotides suivants:

AB154 (32 mer) (SEQ ID N° 27)

5'ACGCGTCGACATGGGGAATGGACAGGGGCGAG 3'

5 AB155 (33 mer) (SEQ ID N° 28)

5'TGAAGATCTTCACTCATCCCCTTCAGGAAGAGC 3'

pour amplifier un fragment de 4635 pb contenant le gène codant pour les protéines Gag et Pro du virus FIV (souche Petaluma) sous la forme d'un fragment Sall-BglII. Après purification, le produit de RT-PCR a été digéré par Sall

10 et BglII pour donner un fragment Sall-BglII de 4622 pb.

Ce fragment a été ligaturé avec le vecteur pVR1012 (exemple 6), préalablement digéré avec Sall et BglII, pour donner le plasmide pAB083 (7436 pb) (Figure N° 15).

15 **Exemple 19 : Construction du plasmide pAB041 (gène G du virus de la rage)**  
Une réaction RT-PCR selon la technique de l'exemple 5 a été réalisée avec l'ARN génomique du virus de la rage (Souche ERA) (A. Anilionis *et al.* Nature. 1981. 294. 275-278), préparé selon la technique de l'exemple 3, et avec les oligonucléotides suivants:

20 AB011 (33 mer) (SEQ ID N° 29)

5'AAACTGCAGAGATGGTTCCTCAGGCTCTCCTG 3'

AB012 (34 mer) (SEQ ID N° 30)

5'CGCGGATCCTCACAGTCTGGTCTACCCCCACTC 3'

25 pour amplifier un fragment de 1589 pb contenant le gène codant pour la glycoprotéine G du virus de la rage. Après purification, le produit de RT-PCR a été digéré par PstI et BamHI pour donner un fragment PstI-BamHI de 1578 pb.

Ce fragment a été ligaturé avec le vecteur pVR1012 (exemple 6), préalablement digéré avec PstI et BamHI, pour donner le plasmide pAB041 (6437 pb) (Figure N° 16).

30

**Exemple 20 : Production et purification des plasmides**

Pour la préparation des plasmides destinés à la vaccination des animaux, on

peut utiliser toute technique permettant d'obtenir une suspension de plasmides purifiés majoritairement sous forme superenroulée. Ces techniques sont bien connues de l'homme de l'art. On peut citer en particulier la technique de lyse alcaline suivie de deux ultracentrifugations successives sur gradient de chlorure de césium en présence de bromure d'éthidium telle que décrite dans J. Sambrook *et al.* (*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2<sup>nd</sup> Edition. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor. New York. 1989). On peut se référer également aux demandes de brevet PCT WO 95/21250 et PCT WO 96/02658 qui décrivent des méthodes pour produire à l'échelle industrielle des plasmides utilisables pour la vaccination. Pour les besoins de la fabrication des vaccins (voir exemple 17), les plasmides purifiés sont resuspendus de manière à obtenir des solutions à haute concentration ( > 2 mg/ml) compatibles avec le stockage. Pour ce faire, les plasmides sont resuspendus soit en eau ultrapure, soit en tampon TE (Tris-HCl 10 mM; EDTA 1 mM, pH 8,0).

15

#### **Exemple 21 : Fabrication des vaccins associés**

Les divers plasmides nécessaires à la fabrication d'un vaccin associé sont mélangés à partir de leurs solutions concentrées (exemple 16). Les mélanges sont réalisés de telle manière que la concentration finale de chaque plasmide corresponde à la dose efficace de chaque plasmide. Les solutions utilisables pour ajuster la concentration finale du vaccin peuvent être soit une solution NaCl à 0,9 % , soit du tampon PBS.

20

Des formulations particulières telles que les liposomes, les lipides cationiques, peuvent aussi être mises en oeuvre pour la fabrication des vaccins.

25

#### **Exemple 22 : Vaccination des chats**

Les chats sont vaccinés avec des doses de 10 µg, 50 µg ou 250 µg par plasmide.

Les injections sont réalisées à l'aiguille par voie intramusculaire. Dans ce cas, les doses vaccinales sont administrées sous un volume de 1 ml.

30

Les injections peuvent aussi être réalisées à l'aiguille par voie intradermique. Dans ce cas, les doses vaccinales sont administrées sous un volume total de

1 ml administré en 10 points de 0,1 ml ou en 20 points de 0,05 ml. Les administrations intradermiques sont réalisées après avoir rasé la peau (flanc thoracique en général) ou bien au niveau d'une région anatomique relativement glabre, par exemple la face interne de la cuisse.

- 5 On peut aussi utiliser un appareil d'injection à jet liquide (sans aiguille) pour les injections intradermiques.

## REVENDEICATIONS

1. Formule de vaccin destiné au chat comprenant au moins trois valences de vaccin polynucléotidique comprenant chacune  
5 un plasmide intégrant, de manière à l'exprimer in vivo dans les cellules hôtes, un gène d'une valence de pathogène félin, ces valences étant choisies parmi le groupe consistant en virus de la leucémie féline, virus de la panleucopénie, virus de la péritonite infectieuse, virus du coryza, virus de la  
10 calicivirose, virus de l'immunodéficience féline et éventuellement virus de la rage, les plasmides comprenant, pour chaque valence, un ou plusieurs des gènes choisis parmi le groupe consistant en env et gag pour la leucémie féline, VP2 pour la panleucopénie, S modifié et M pour la péritonite  
15 infectieuse, gB et gD pour le coryza, capside pour la calicivirose, env et gag/pro pour l'immunodéficience féline et G pour la rage.

2. Formule de vaccin selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'il comporte les valences panleucopénie,  
20 coryza et calicivirose.

3. Formule de vaccin selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce qu'elle comprend les gènes gB et gD du virus coryza, dans le même plasmide ou dans des plasmides différents, ou un seul de ces gènes.

25 4. Formule selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle comprend les gènes env et gag du virus de la leucémie féline, dans le même plasmide ou dans des plasmides différents, ou le gène env seul.

5. Formule de vaccin selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle comprend les deux gènes env et  
30 gag/pro dans des plasmides différents ou dans le même plasmide, ou un seul de ces gènes.

6. Formule de vaccin selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce qu'elle comprend le gène M ou le gène S  
35 modifié dans un plasmide ou l'ensemble des gènes codant pour M et S modifié dans le même plasmide ou dans des plasmides différents.

7. Formule de vaccin selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisée en ce qu'elle comprend de 10

ng à 1 mg, de préférence de 100 ng à 500 µg, plus préférentiellement encore de 1 µg à 250 µg de chaque plasmide.

8. Utilisation d'un ou de plusieurs plasmides tels que décrits dans l'une quelconque des revendications 1 à 7, pour la

5 fabrication d'un vaccin destiné à vacciner les chats primo-vaccinés au moyen d'un premier vaccin choisi dans le groupe consistant en vaccin entier vivant, vaccin entier inactivé, vaccin de sous-unité, vaccin recombinant, ce premier vaccin présentant le ou les antigènes codés par le ou les plasmides ou  
10 antigènes assurant une protection croisée.

9. Kit de vaccination pour chat regroupant une formule de vaccin selon l'une quelconque des revendications 1 à 8 et un vaccin pour chat choisi dans le groupe consistant en vaccin  
15 entier vivant, vaccin entier inactivé, vaccin de sous-unité, vaccin recombinant, ce premier vaccin présentant l'antigène codé par le vaccin polynucléotidique ou un antigène assurant une protection croisée, pour une administration de ce dernier en primo-vaccination et pour un rappel avec la formule de  
20 vaccin.

20

25

30

35

1/19

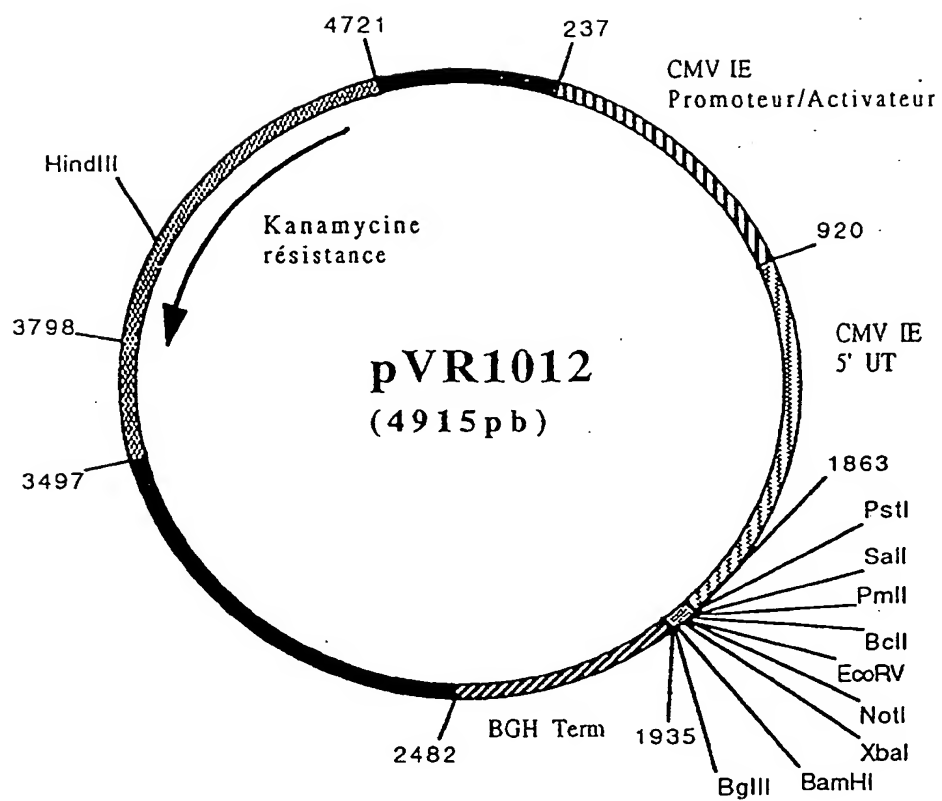


Figure N° 1

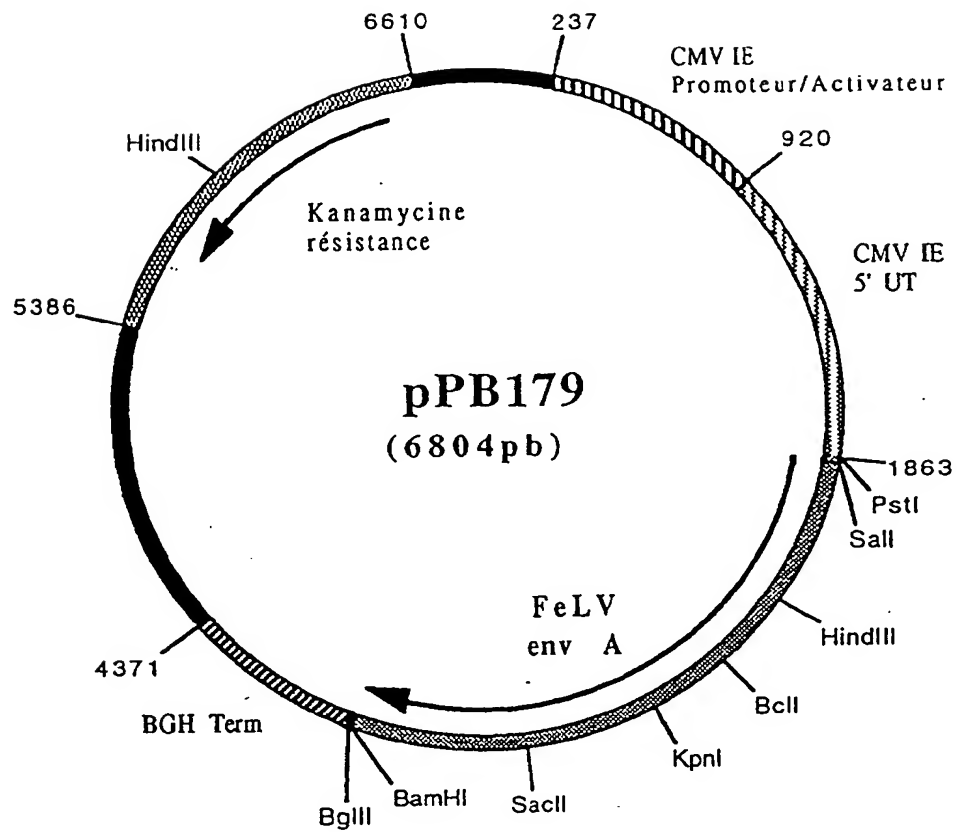


Figure N° 2



3/19

1 ATGGAAGGTCCAACGCACCCAAAACCTCTAAAGATAAGACTTTCTCGTGGGACCTAATGATT  
 1 MetGluGlyProThrHisProLysProSerLysAspLysThrPheSerTrpAspLeuMetIle  
 64 CTGGTGGGGGTCTTACTAAGACTGGACGTGGGAATGGCCAATCCTAGTCCGCACCAAATATAT  
 22 LeuValGlyValLeuLeuArgLeuAspValGlyMetAlaAsnProSerProHisGlnIleTyr  
 127 AATGTAACCTTGGACAATAACCAACCTTGTAACTGGAACAAAGGCTAATGCCACCTCCATGTTG  
 43 AsnValThrTrpThrIleThrAsnLeuValThrGlyThrLysAlaAsnAlaThrSerMetLeu  
 190 GGAACCCCTGACAGACGCCTTCCCTACCATGTATTTTGACTTATGTGATATAATAGGAAATACA  
 64 GlyThrLeuThrAspAlaPheProThrMetTyrPheAspLeuCysAspIleIleGlyAsnThr  
 253 TGAACCCCTTCAGATCAAGAACCATTCCCAGGGTATGGATGTGATCAGCCTATGAGGAGGTGG  
 85 TrpAsnProSerAspGlnGluProPheProGlyTyrGlyCysAspGlnProMetArgArgTrp  
 316 CGACAGAGAAACACACCCCTTTTATGTCTGTCCAGGACATGCCAACCGGAAGCAATGTGGGGGG  
 106 ArgGlnArgAsnThrProPheTyrValCysProGlyHisAlaAsnArgLysGlnCysGlyGly  
 379 CCACAGGATGGGTTCTGCGCTGTATGGGGTTGCGAGACCACCGGGGAAACCTATTGGAGACCC  
 127 ProGlnAspGlyPheCysAlaValTrpGlyCysGluThrThrGlyGluThrTyrTrpArgPro  
 442 ACCTCCTCATGGGACTACATCACAGTAAAAAAGGGGTTACTCAGGGAATATATCAATGTAGT  
 148 ThrSerSerTrpAspTyrIleThrValLysLysGlyValThrGlnGlyIleTyrGlnCysSer  
 505 GGAGGTGGTTGGTGTGGGCCCTGTTACGATAAAGCTGTTCACTCCTCGACAACGGGAGCTAGT  
 169 GlyGlyGlyTrpCysGlyProCysTyrAspLysAlaValHisSerSerThrThrGlyAlaSer  
 568 GAAGGGGGCCGGTGCAACCCCTTGATCTTGCAATTTACCCAAAAGGGAAGACAAACATCTTGG  
 190 GluGlyGlyArgCysAsnProLeuIleLeuGlnPheThrGlnLysGlyArgGlnThrSerTrp  
 631 GATGGACCTAAGTCATGGGGGCTACGACTATACCGTTCAGGATATGACCCTATAGCCCTGTTC  
 211 AspGlyProLysSerTrpGlyLeuArgLeuTyrArgSerGlyTyrAspProIleAlaLeuPhe  
 694 TCGGTATCCCGGCAAGTAATGACCATTACGCCGCCCTCAGGCCATGGGACCAAATCTAGTCCTG  
 232 SerValSerArgGlnValMetThrIleThrProProGlnAlaMetGlyProAsnLeuValLeu  
 757 CCTGATCAAAAACCCCCATCCAGGCAATCTCAAATAGAGTCCCGAGTAACACCTCACCATTCC  
 253 ProAspGlnLysProProSerArgGlnSerGlnIleGluSerArgValThrProHisHisSer  
 820 CAAGGCAACGGAGGCACCCCAGGTGTAACCTTGTTAATGCCTCCATTGCCCCCTCTACGTACC  
 274 GlnGlyAsnGlyGlyThrProGlyValThrLeuValAsnAlaSerIleAlaProLeuArgThr  
 883 CCTGTCACCCCCGCAAGTCCCAAACGTATAGGGACCGGAAATAGGTTAATAAATTTAGTGCAA  
 295 ProValThrProAlaSerProLysArgIleGlyThrGlyAsnArgLeuIleAsnLeuValGln  
 946 GGGACATACCTAGCCTTAAATGCCACCGACCCCAACAAAACCTAAAGACTGTTGGCTCTGCCTG  
 316 GlyThrTyrLeuAlaLeuAsnAlaThrAspProAsnLysThrLysAspCysTrpLeuCysLeu  
 1009 GTTCTCGACCACCTTATTACGAAGGGATTGCAATCTTAGGTAACCTACAGCAACCAAACAAAC  
 337 ValSerArgProProTyrTyrGluGlyIleAlaIleLeuGlyAsnTyrSerAsnGlnThrAsn  
 1072 CCCTCCCCATCCTGCCTATCTACTCCGCAACATAAGCTAACTATATCTGAGGTGTCAGGGCAA  
 358 ProSerProSerCysLeuSerThrProGlnHisLysLeuThrIleSerGluValSerGlyGln  
 1135 GGAAGTGTGCATAGGGACTGTTCTAAGACCCACCAGGCTTTGTGCAATAAGACACAACAGGGA  
 379 GlyLeuCysIleGlyThrValProLysThrHisGlnAlaLeuCysAsnLysThrGlnGlnGly  
 1198 CATACAGGGGCTCACTATCTAGCCGCCCCCAATGGCACCTATTGGGCCTGTAACACTGGACTC  
 400 HisThrGlyAlaHisTyrLeuAlaAlaProAsnGlyThrTyrTrpAlaCysAsnThrGlyLeu

Figure N° 3

4119

1261 ACCCCATGCATTTCCATGGCAGTGCTCAATTGGACCTCTGATTTTTGTGTCTTAATCGAATTA  
421▶ ThrProCysIleSerMetAlaValLeuAsnTrpThrSerAspPheCysValLeuIleGluLeu

1324 TGGCCCAGAGTGACCTACCATCAACCCGAATACATTTACACACATTTTCGACAAAGCTGTCAGG  
442▶ TrpProArgValThrTyrHisGlnProGluTyrIleTyrThrHisPheAspLysAlaValArg

1387 TTCCGAAGAGAACCAATATCACTAACCCTTGCCCTTATAATGGGAGGACTCACTGTAGGGGGC  
463▶ PheArgArgGluProIleSerLeuThrValAlaLeuIleMetGlyGlyLeuThrValGlyGly

1450 ATAGCCGCGGGGGTTCGGAACAGGGACTAAAGCCCTCCTTGAAACAGCCCAGTTCAGACAATA  
484▶ IleAlaAlaGlyValGlyThrGlyThrLysAlaLeuLeuGluThrAlaGlnPheArgGlnLeu

1513 CAAATGGCTATGCACGCAGACATCCAGGCCCTAGAAGAGTCAATTAGTGCCTTAGAAAAATCC  
505▶ GlnMetAlaMetHisAlaAspIleGlnAlaLeuGluGluSerIleSerAlaLeuGluLysSer

1576 CTGACCTCCCTCTCCGAGGTAGTCTTACAAAATAGACGGGGCCTAGATATTCTGTTCTTACAA  
526▶ LeuThrSerLeuSerGluValValLeuGlnAsnArgArgGlyLeuAspIleLeuPheLeuGln

1639 AAGGGAGGGCTCTGTGCCGCCTTAAAGGAAGAATGCTGCTTCTATGCAGATCACACCGGACTC  
547▶ LysGlyGlyLeuCysAlaAlaLeuLysGluGluCysCysPheTyrAlaAspHisThrGlyLeu

1702 GTCAGAGACAATATGGCTAAATTAAGAGAAAGACTGAAACAGCGACAACAACACTGTTTGACTCC  
568▶ ValArgAspAsnMetAlaLysLeuArgGluArgLeuLysGlnArgGlnGlnLeuPheAspSer

1765 CAACAGGGATGGTTTGAAGGATGGTTCAACAAGTCCCCCTGGTTTACAACCCTAATTTCTCTCC  
589▶ GlnGlnGlyTrpPheGluGlyTrpPheAsnLysSerProTrpPheThrThrLeuIleSerSer

1828 ATTATAGGCCCTTACTAATCCTACTCCTAATTCTCCTCTTCGGCCCATGCATCCTTAACCGA  
610▶ IleIleGlyProLeuLeuIleLeuLeuLeuIleLeuLeuPheGlyProCysIleLeuAsnArg

1891 TTAGTGCAATTCGTAAAAGACAGAATATCTGTGGTACAAGCCTTAATTTTAACCCAACAGTAC  
631▶ LeuValGlnPheValLysAspArgIleSerValValGlnAlaLeuIleLeuThrGlnGlnTyr

1954 CAACAGATACAGCAATATGATCCGGACCGACCATGA  
652▶ GlnGlnIleGlnGlnTyrAspProAspArgPro...

Figure N° 3 (suite et fin)

5/19

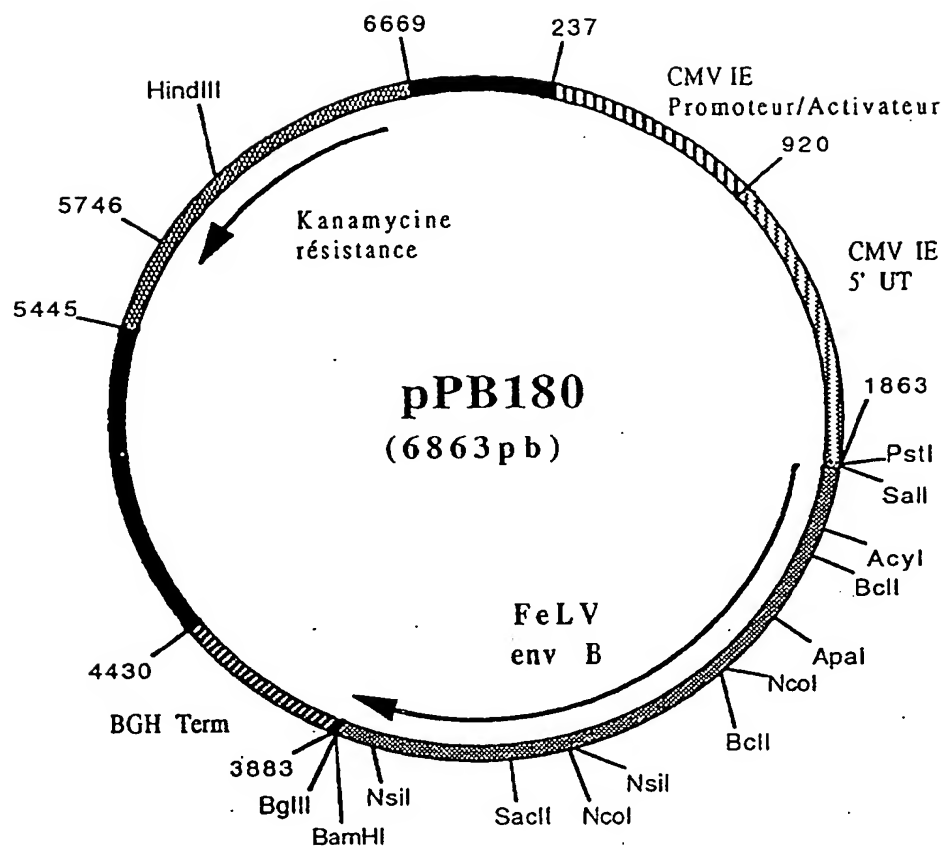


Figure N° 4

6/19

1 ATGTCCTGGAGCCTCTAGTGGGACAGCCATTGGGGCTCATCTGTTTGGGGTCTCACCTGAATAC  
1 MetSerGlyAlaSerSerGlyThrAlaIleGlyAlaHisLeuPheGlyValSerProGluTyr

64 AGGGTGTGATCGGAGACGAGGGAGCCGGACCCTCAAGGTCTCTTTCTGAGGTTTCATTTTCG  
22 ArgValLeuIleGlyAspGluGlyAlaGlyProSerArgSerLeuSerGluValSerPheSer

127 GTTTGGTACCAAAGACGCGCGGCACGTCTTGTCATTTTTTGTCTGGTTGCGTCTTTTCTTGTC  
43 ValTrpTyrGlnArgArgAlaAlaArgLeuValIlePheCysLeuValAlaSerPheLeuVal

190 CCTTGTCTAACCTTTTTTAATTGCAGAAACCGTCATGGGCCAAACTATAACTACCCCTTAAGC  
64 ProCysLeuThrPheLeuIleAlaGluThrValMetGlyGlnThrIleThrThrProLeuSer

253 CTCACCCTTGATCACTGGTCTGAAGTCCGGGCACGAGCCCATAATCAAGGTGTGAGGTCCGG  
85 LeuThrLeuAspHisTrpSerGluValArgAlaArgAlaHisAsnGlnGlyValGluValArg

316 AAAAAGAAATGGATTACCTTATGTGAGGCCGAATGGGTGATGATGAATGTGGGCTGGCCCCGA  
106 LysLysLysTrpIleThrLeuCysGluAlaGluTrpValMetMetAsnValGlyTrpProArg

379 GAAGGAACTTTTCTCTTGATAGCATTTCCAGGTTGAAAAGAAGATCTTCGCCCCGGGACCA  
127 GluGlyThrPheSerLeuAspSerIleSerGlnValGluLysLysIlePheAlaProGlyPro

442 TATGGACACCCCGACCAAGTTCCTTACATTACTACATGGAGATCCTTAGCCACAGACCCCCCT  
148 TyrGlyHisProAspGlnValProTyrIleThrThrTrpArgSerLeuAlaThrAspProPro

505 TCGTGGGTTCGTCCGTTCTACCCCTCCCAAACCTCCACACCCCTCCCTCAACCTCTTTTCG  
169 SerTrpValArgProPheLeuProProProLysProProThrProLeuProGlnProLeuSer

568 CCGCAGCCCTCCGCCCCCTTACCTCTTCCCTCTACCCCGTTCTCCCAAGCCAGACCCCCC  
190 ProGlnProSerAlaProLeuThrSerSerLeuTyrProValLeuProLysProAspProPro

631 AAACCGCTGTGTTACCGCCTGATCCTTCTTCCCTTTAATTGATCTCTTAACAGAAGAGCCA  
211 LysProProValLeuProProAspProSerSerProLeuIleAspLeuLeuThrGluGluPro

694 CCTCCCTATCCGGGGGGTACGGGGCCACCGCCATCAGGTCCTAGGACCCCAACCGCTTCCCCG  
232 ProProTyrProGlyGlyHisGlyProProProSerGlyProArgThrProThrAlaSerPro

757 ATTGCAAGCCGGCTAAGGGAACGACGAGAAAACCTGCTGAAGAATCGCAAGCCCTCCCTTG  
253 IleAlaSerArgLeuArgGluArgArgGluAsnProAlaGluGluSerGlnAlaLeuProLeu

820 AGGGAAGGCCCAACAACCGACCCAGTATTGGCCATTCTCAGCTTCAGACTTGTATAACTGG  
274 ArgGluGlyProAsnAsnArgProGlnTyrTrpProPheSerAlaSerAspLeuTyrAsnTrp

883 AAGTCGCATAACCCCCCTTCTCCCAAGATCCAGTGGCCCTAACTAACCTAATTGAGTCCATT  
295 LysSerHisAsnProProPheSerGlnAspProValAlaLeuThrAsnLeuIleGluSerIle

946 TTAGTGACGCATCAACCAACCTGGGACGACTGCCAGCAGCTCTTGCAAGGCACTCCTGACAGGC  
316 LeuValThrHisGlnProThrTrpAspAspCysGlnGlnLeuLeuGlnAlaLeuLeuThrGly

1009 GAAGAAAGGCAAAGGGTCTTCTTGAGGCCCCGAAAGCAGGTTCCAGGCGAGGACGGACGGCCA  
337 GluGluArgGlnArgValLeuLeuGluAlaArgLysGlnValProGlyGluAspGlyArgPro

1072 ACCCAACTACCCAATGTCATTGACGAGACTTTCCCTTGACCCGTCCCAACTGGGATTTTGCT  
358 ThrGlnLeuProAsnValIleAspGluThrPheProLeuThrArgProAsnTrpAspPheAla

1135 ACGCCGGCAGGTAGGGAGCACCTACGCCTTTATCGCCAGTTGCTATTAGCGGGTCTCCGCGGG  
379 ThrProAlaGlyArgGluHisLeuArgLeuTyrArgGlnLeuLeuLeuAlaGlyLeuArgGly

Figure N° 5

7 / 19

1198 GCTGCAAGACGCCCCACTAATTTGGCACAGGTAAAGCAGGTTGTACAAGGGAAAGAGGAAACG  
 400 ▶ AlaAlaArgArgProThrAsnLeuAlaGlnValLysGlnValValGlnGlyLysGluGluThr  
 1261 CCAGCAGCATTTTTAGAAAGATTAAAAGAGGCTTATAGAATGTACACTCCCTATGACCCTGAG  
 421 ▶ ProAlaAlaPheLeuGluArgLeuLysGluAlaTyrArgMetTyrThrProTyrAspProGlu  
 1324 GACCCAGGGCAAGCGGCTAGTGTATCCTATCCTTTATATACCAGTCTAGCCAGATATAAGA  
 442 ▶ AspProGlyGlnAlaAlaSerValIleLeuSerPheIleTyrGlnSerSerProAspIleArg  
 1387 AATAAGTTACAAAGGCTAGAAGGCCTACAAGGGTTCACCCTATCTGATCTGCTAAAAGAGGCA  
 463 ▶ AsnLysLeuGlnArgLeuGluGlyLeuGlnGlyPheThrLeuSerAspLeuLeuLysGluAla  
 1450 GAAAAGATATACAACAAAAGGGAGACCCAGAGGAAAGGGAAGAAAGATTATGGCAGCGACAG  
 484 ▶ GluLysIleTyrAsnLysArgGluThrProGluGluArgGluGluArgLeuTrpGlnArgGln  
 1513 GAAGAAAGAGATAAAAAGCGCCACAAGGAGATGACTAAAGTTCTGGCCACAGTAGTTGCTCAG  
 505 ▶ GluGluArgAspLysLysArgHisLysGluMetThrLysValLeuAlaThrValValAlaGln  
 1576 AATAGAGATAAGGATAGAGAAGAAAGTAAACTGGGGGATCAAAGGAAAATACCTCTGGGGAAA  
 526 ▶ AsnArgAspLysAspArgGluGluSerLysLeuGlyAspGlnArgLysIleProLeuGlyLys  
 1639 GACCAAGTGTGCCTATTGCAAGGAAAAGGGGCATTGGGTTGCGGATTGCCCCAAACGACCCAGG  
 547 ▶ AspGlnCysAlaTyrCysLysGluLysGlyHisTrpValArgAspCysProLysArgProArg  
 1702 AAGAAACCCGCCAACTCCACTCTCCTCAACTTAGGAGATTAGGAGAGTCAGGGCCAGGACCCC  
 568 ▶ LysLysProAlaAsnSerThrLeuLeuAsnLeuGlyAsp...  
 1 ▶ GluIleArgArgValArgAlaArgThrPr  
 1765 CCCCCCTGAGCCAGGATAACCTTAAAAATAGGGGGGCAACCGGTGACTTTTCTGGTGACAC  
 10 ▶ oProProGluProArgIleThrLeuLysIleGlyGlyGlnProValThrPheLeuValAspTh  
 1828 GGGAGCCCAGCACTCAGTACTGACTCGACCAGATGGACCTCTCAGTGACCGCACAGCCCTGGT  
 31 ▶ rGlyAlaGlnHisSerValLeuThrArgProAspGlyProLeuSerAspArgThrAlaLeuVa  
 1891 GCAAGGAGCCACGGGAAGCAAAAACCTACCGGTGGACCACCGACAGGAGGGTACAACCTGGCAAC  
 52 ▶ lGlnGlyAlaThrGlySerLysAsnTyrArgTrpThrThrAspArgArgValGlnLeuAlaTh  
 1954 CGGTAAGGTGACTCATTCTTTTATATGTACCTGAATGTCCCTACCCGTTATTAGGGAGAGA  
 73 ▶ rGlyLysValThrHisSerPheLeuTyrValProGluCysProTyrProLeuLeuGlyArgAs  
 2017 CCTATTAATAAATAAGGCCCAAATCCATTTTACCGGAGAAGGGGCTAATGTTGTTGGGCC  
 94 ▶ pLeuLeuThrLysLeuLysAlaGlnIleHisPheThrGlyGluGlyAlaAsnValValGlyPr  
 2080 CAGGGGTTTACCCCTACAAGTCCTTACTTTACAATTAGAAGAGGAGTATCGGCTATTTGAGCC  
 115 ▶ oArgGlyLeuProLeuGlnValLeuThrLeuGlnLeuGluGluGluTyrArgLeuPheGluPr  
 2143 AGAAAGTACACAAAAACAGGAGATGGACACTTGGCTTAAAACTTTCCCCAGGCGTGCGGCAGA  
 136 ▶ oGluSerThrGlnLysGlnGluMetAspThrTrpLeuLysAsnPheProGlnAlaTrpAlaGl

Figure N° 5 (suite)

8 / 19

2206 AACAGGAGGTATGGGAATGGCTCATTGTCAAGCCCCCGTTCTCATTTCAACTTAAGGCTACTGC  
157▶ uThrGlyGlyMetGlyMetAlaHisCysGlnAlaProValLeuIleGlnLeuLysAlaThrAl  
2269 CACTCCAATCTCCATCCGACAGTATCCTATGCCCCATGAAGCGTACCAGGGAATTAAGCCTCA  
178▶ aThrProIleSerIleArgGlnTyrProMetProHisGluAlaTyrGlnGlyIleLysProHi  
2332 TATAAGAAGAATGCTAGATCAAGGCATCCTCAAGCCCTGCCAGTCCCCATGGAATACACCCTT  
199▶ sIleArgArgMetLeuAspGlnGlyIleLeuLysProCysGlnSerProTrpAsnThrProLe  
2395 ATTACCTGTTAAGAAGCCAGGGACCGAGGATTACAGACCAGTGCAGGACTTAAGAGAAGTAAA  
220▶ uLeuProValLysLysProGlyThrGluAspTyrArgProValGlnAspLeuArgGluValAs  
2458 CAAAAGAGTAGAAGACATCCATCCTACTGTGCCAAATCCATATAACCTCCTTAGCACCCCTCCC  
241▶ nLysArgValGluAspIleHisProThrValProAsnProTyrAsnLeuLeuSerThrLeuPr  
2521 GCCGTCTCACCCCTTGGTACACTGTCCTAGATTTAAAGGACGCTTTTTTCTGCCTGCGACTACA  
262▶ oProSerHisProTrpTyrThrValLeuAspLeuLysAspAlaPhePheCysLeuArgLeuHi  
2584 CTCTGAGAGTCAGTTACTTTTTGCATTTGAATGGAGAGATCCAGAAATAGGACTGTCAGGGCA  
283▶ sSerGluSerGlnLeuLeuPheAlaPheGluTrpArgAspProGluIleGlyLeuSerGlyGl  
2647 ACTAACCTGGACACGCCTTCCTCAGGGGTCAAGAATAGCCCCACCCTATTTGATGAGGCCCT  
304▶ nLeuThrTrpThrArgLeuProGlnGlyPheLysAsnSerProThrLeuPheAspGluAlaLe  
2710 GCACTCAGACCTGGCCGATTTTCAGGGTAAGGTACCCGGCTCTAGTCCTCCTACAATATGTAGA  
325▶ uHisSerAspLeuAlaAspPheArgValArgTyrProAlaLeuValLeuLeuGlnTyrValAs  
2773 TGACCTCTTGCTGGCTGCGGCAACCAGGACTGAATGCCTGGAAGGGACTAAGGCACTCCTTGA  
346▶ pAspLeuLeuLeuAlaAlaAlaThrArgThrGluCysLeuGluGlyThrLysAlaLeuLeuGl  
2836 GACTTTGGGCAATAAGGGGTACCGAGCCTCTGGAAAGAAGGCCCAAATTTGCCTGCAAGAAGT  
367▶ uThrLeuGlyAsnLysGlyTyrArgAlaSerGlyLysLysAlaGlnIleCysLeuGlnGluVa  
2899 CACATACCTGGGGTACTCTTTAAAAGATGGCCAAAGGTGGCTTACCAAAGCTCGGAAAGAAGC  
388▶ lThrTyrLeuGlyTyrSerLeuLysAspGlyGlnArgTrpLeuThrLysAlaArgLysGluAl  
2962 CATCCTATCCATCCCTGTGCCTAAAAACCCACGACAAGTGAGAGAGTTCCCTTGGAACTGCAG  
409▶ aIleLeuSerIleProValProLysAsnProArgGlnValArgGluPheLeuGlyThrAla

Figure N° 5 (suite et fin)

9119

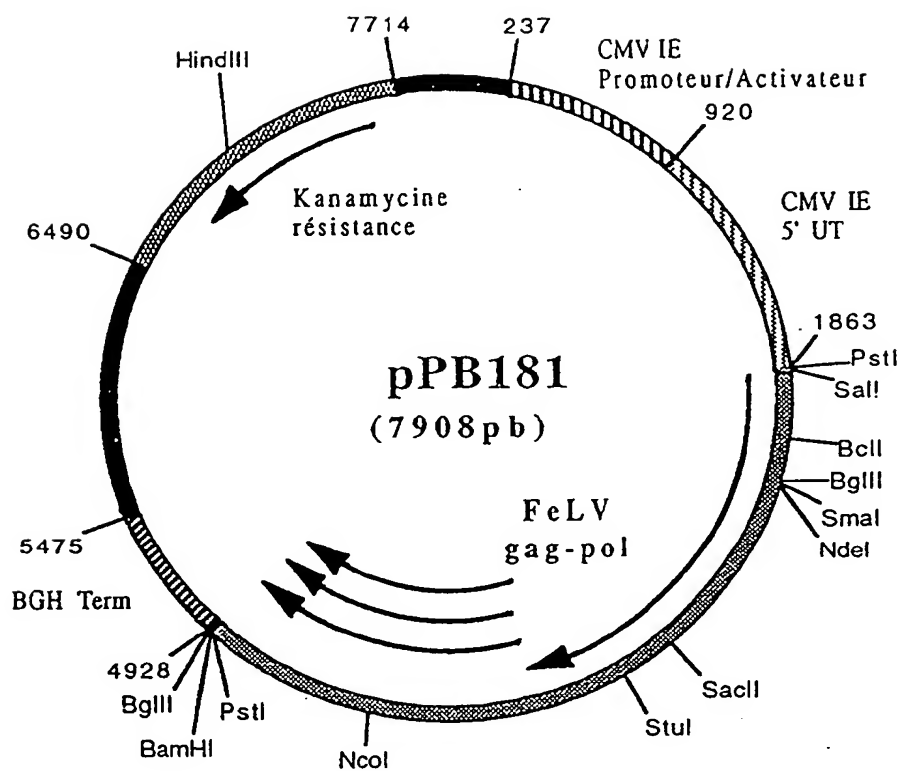


Figure N° 6

10 / 19

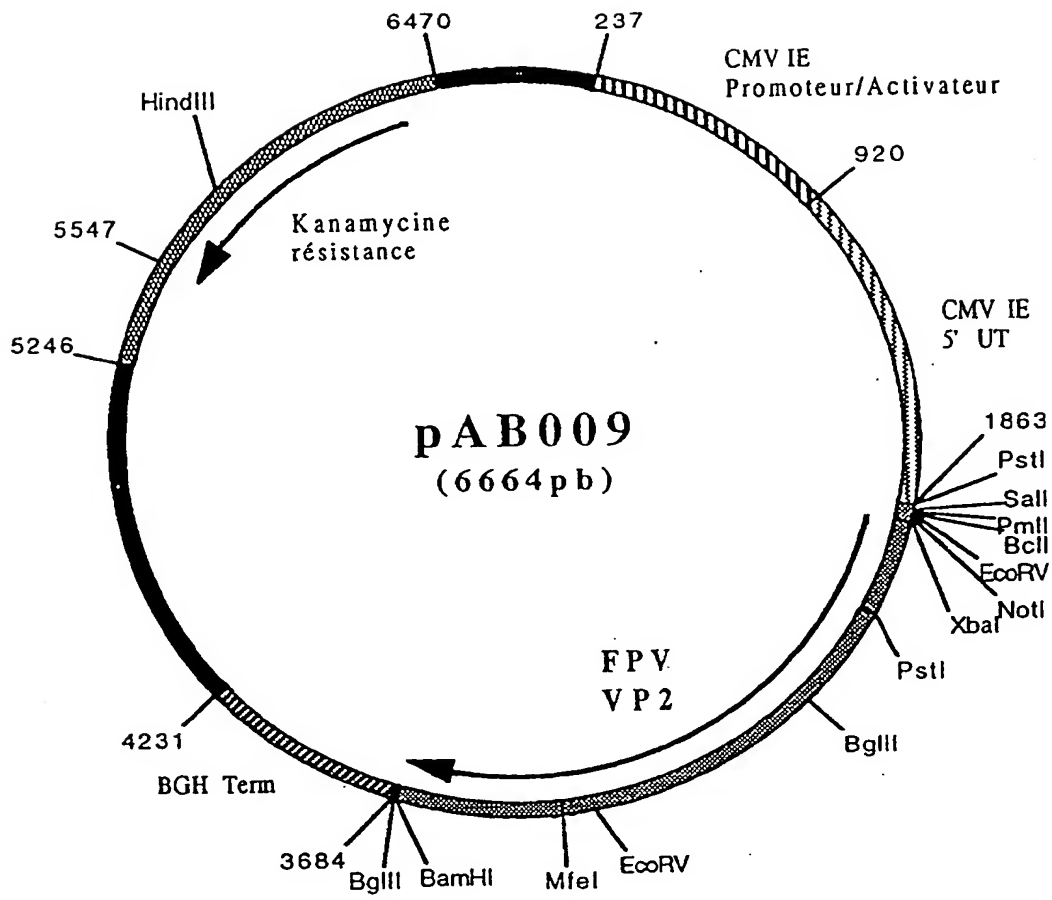


Figure N° 7



11 119

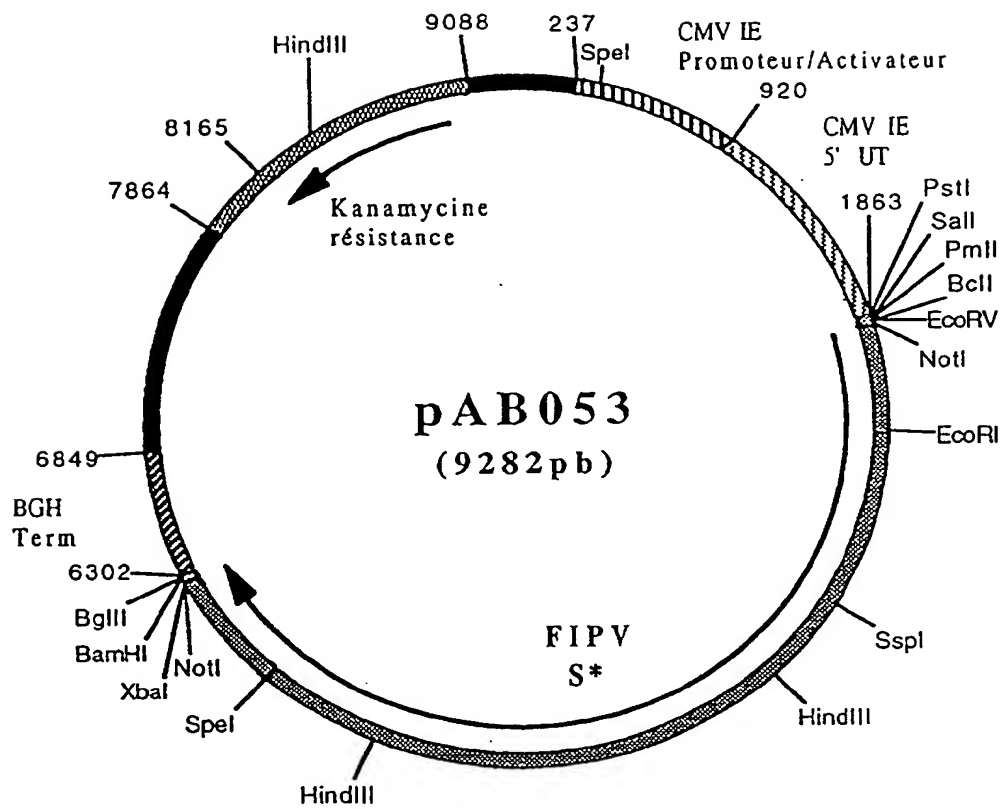


Figure N° 8

12/19

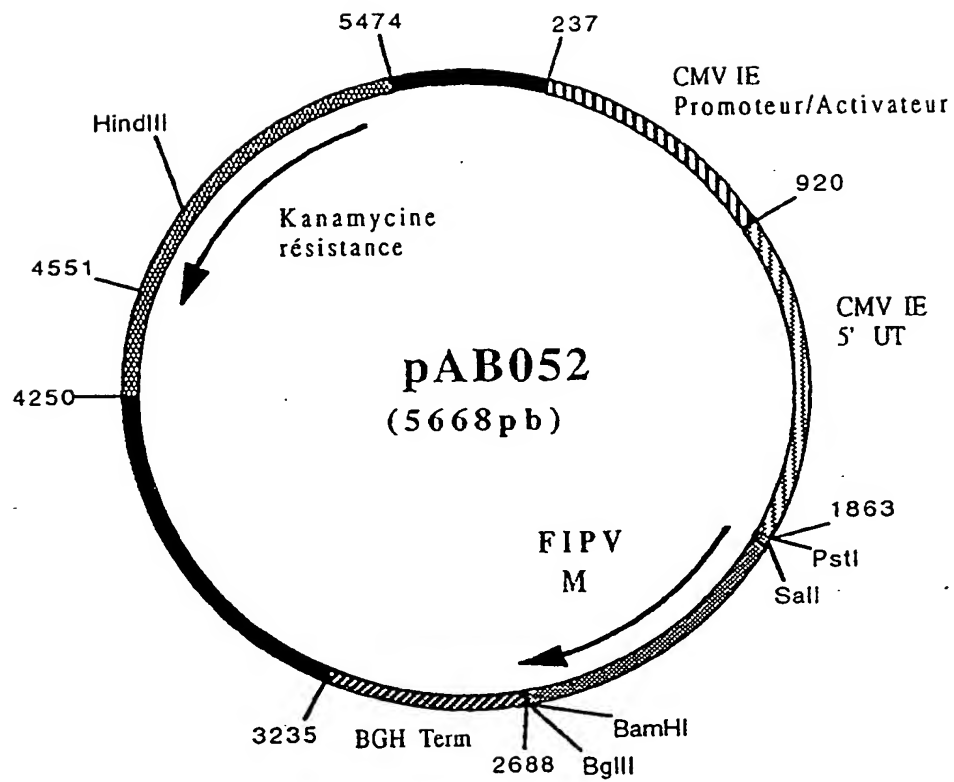


Figure N° 9

13/19

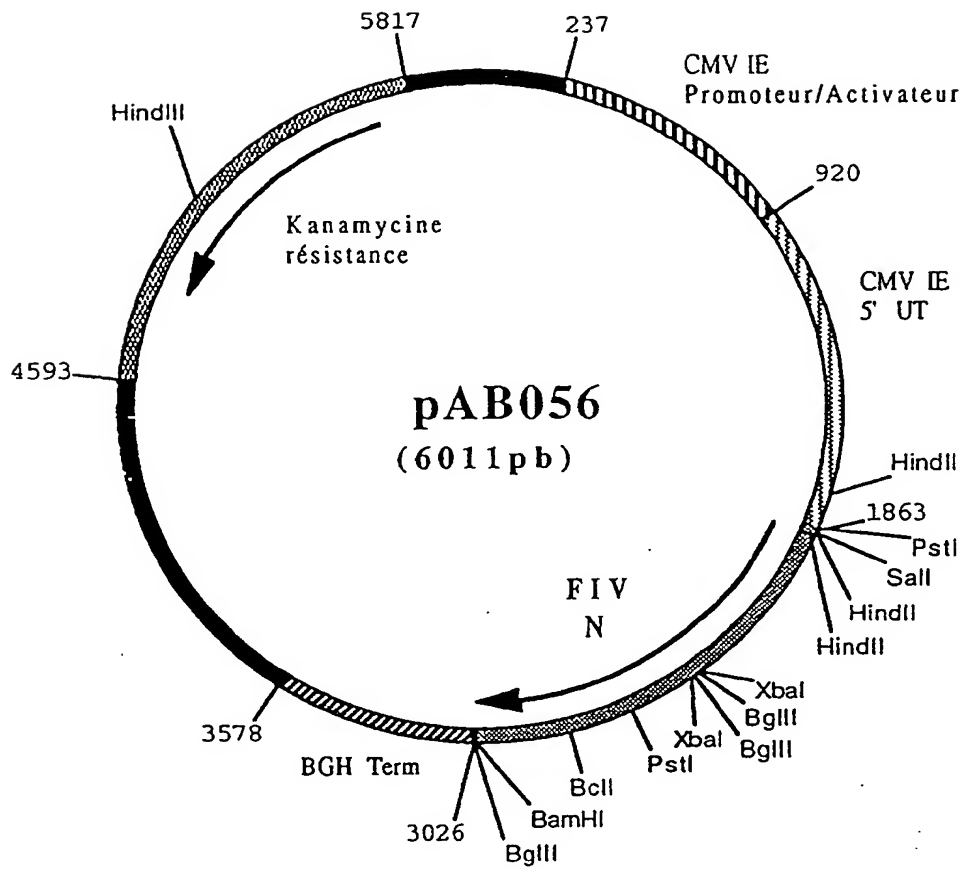


Figure N° 10

14 / 19

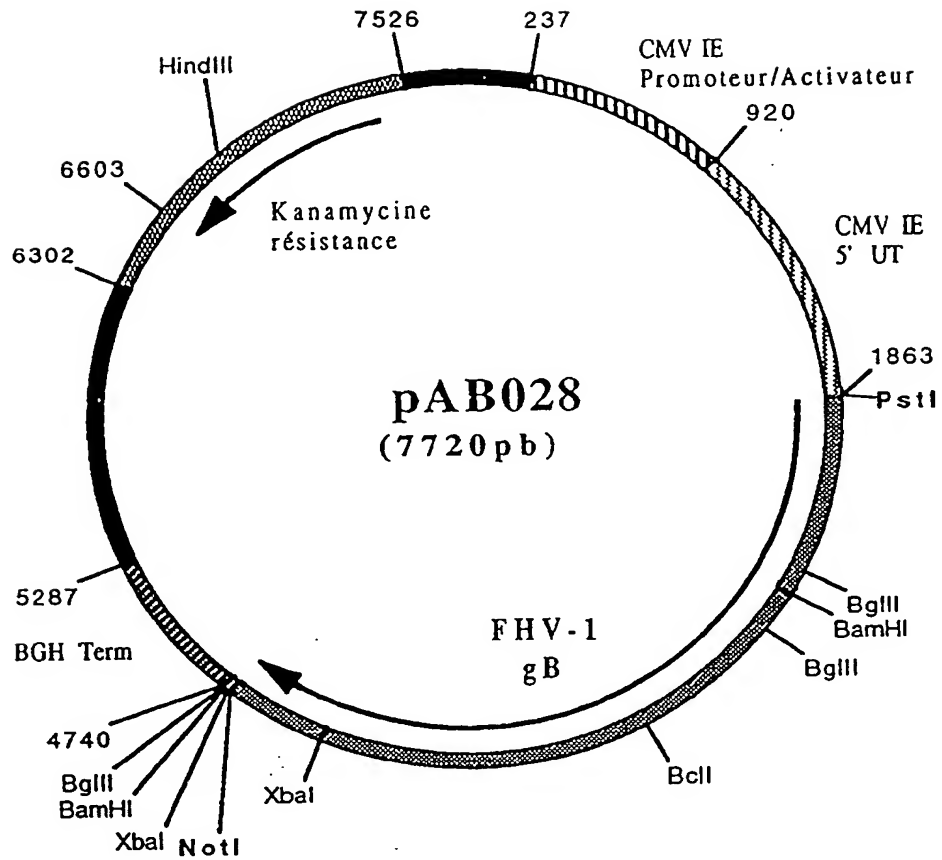


Figure N° 11

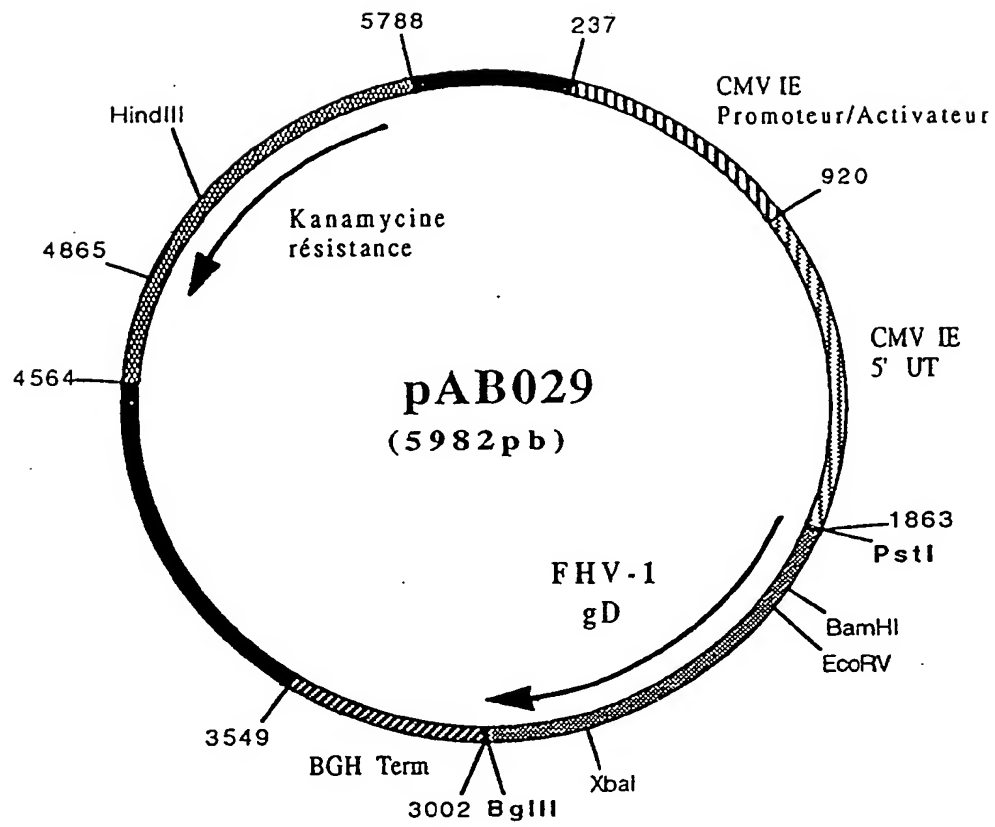


Figure N° 12

16/19

2751223

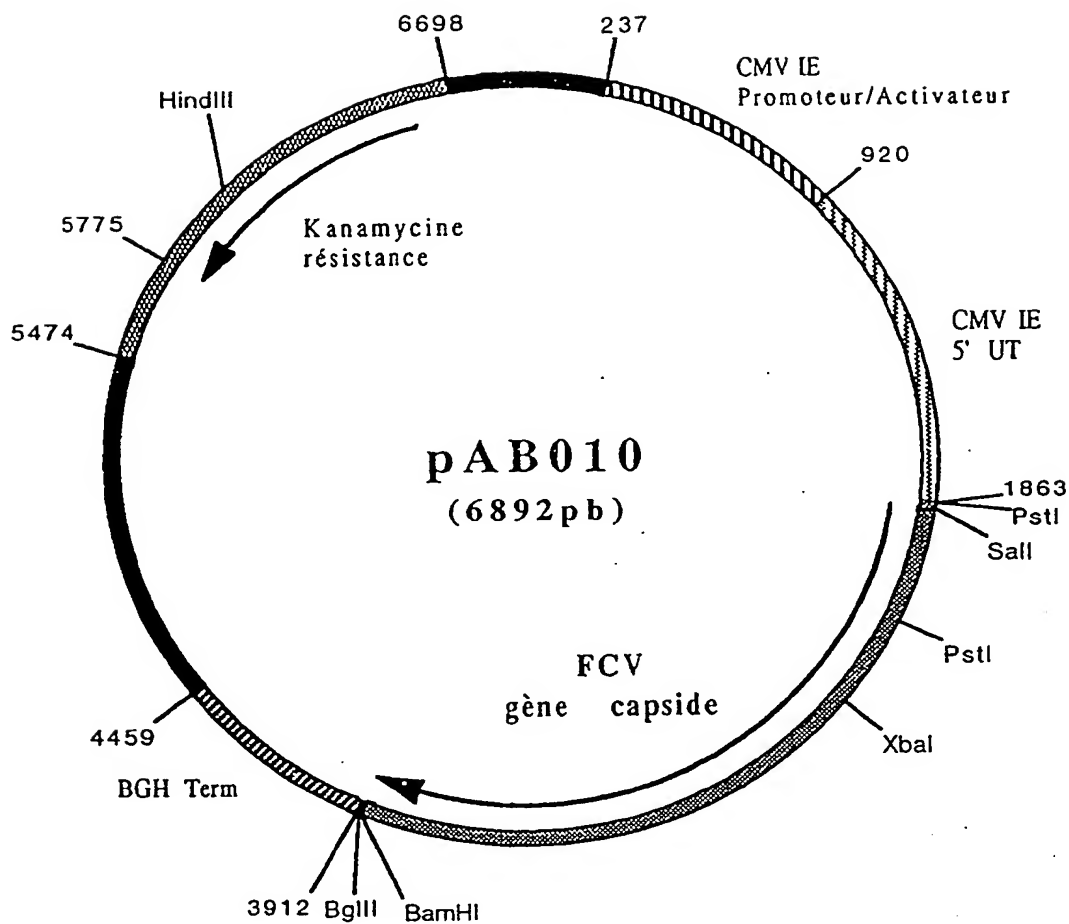


Figure N° 13

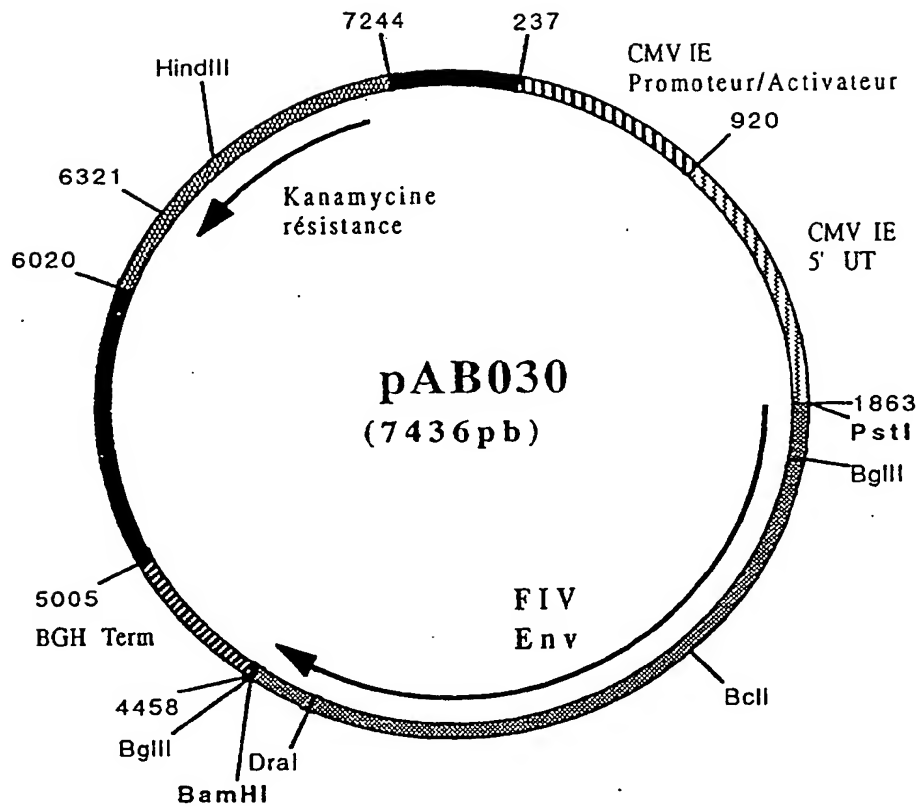
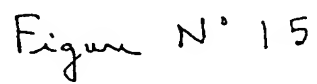


Figure N° 14





19/19

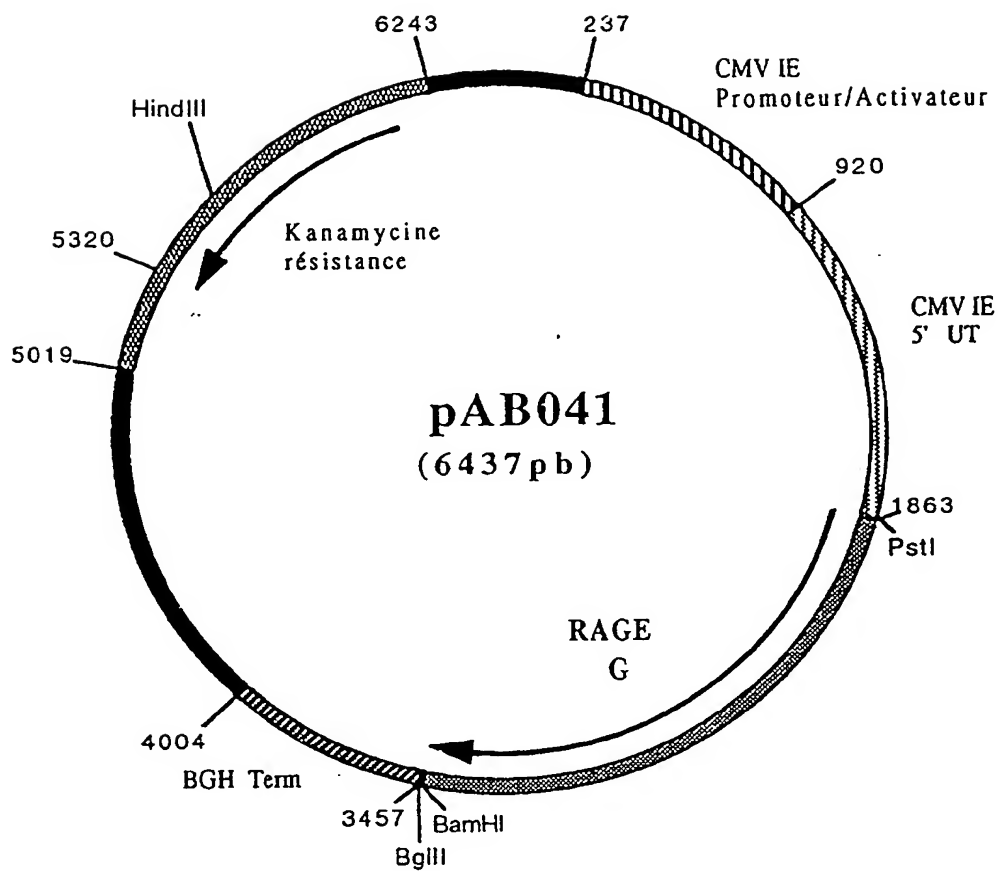


Figure N° 16

REPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL  
de la  
PROPRIETE INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE  
PRELIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement de la recherche

2751223  
N° d'enregistrement  
national

FA 533539  
FR 9609337

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
X	JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY, vol. 73, no. PART 07, 1 Juillet 1992, pages 1811-1818, XP000288657	8,9
A	WARDLEY R C ET AL: "THE USE OF FELINE HERPESVIRUS AND BACULOVIRUS AS VACCINE VECTORS FOR THE GAG AND ENV GENES OF FELINE LEUKAEMIA VIRUS" * page 1811, abrégé *	1-7
D,X A	--- WO 96 06934 A (RHONE MERIEUX) 7 Mars 1996 * revendications 1,11 *	8,9 1-7
D,A	--- WO 95 20660 A (UNIV MASSACHUSETTS MEDICAL ;ST JUDE CHILDREN S RESEARCH HO (US)) 3 Août 1995 * page 1, ligne 27 - page 3, ligne 13 * * page 6, ligne 16 - page 13, ligne 33 * -----	1-9
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.CL.6)
		C07K A61K
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
7 Avril 1997		Sitch, W
<p><b>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</b></p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons</p> <p>&amp; : membre de la même famille, document correspondant</p>		

1

EPO FORM 1503 QLEZ (P04C13)